

EA

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12P 7/64, C12N 1/14</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/29558</p> <p>(43) 国際公開日 1998年7月9日(09.07.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04898</p> <p>(22) 国際出願日 1997年12月26日(26.12.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/349541 1996年12月27日(27.12.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 東山堅一(HIGASHIYAMA, Kenichi)[JP/JP] 〒618 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-602 Osaka, (JP) 矢口敏昭(YAGUCHI, Toshiaki)[JP/JP] 〒618 大阪府三島郡島本町山崎5-2-5 Osaka, (JP) 秋元健吾(AKIMOTO, Kengo)[JP/JP] 〒618 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-1006 Osaka, (JP) 清水 昌(SHIMIZU, Sakayu)[JP/JP] 〒616 京都府京都市右京区常盤山下町6-9 Kyoto, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MEDIA FOR CULTURING MICROORGANISMS AND PROCESS FOR PRODUCING UNSATURATED FATTY ACIDS OR LIPIDS CONTAINING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 微生物培養用培地、並びに不飽和脂肪酸またはこれを含有する脂質の製造方法</p> <p>(57) Abstract A method for controlling the mycological morphology of microorganisms belonging to the genus <i>Mortierella</i> by using media for culturing microorganisms which contain 5 to 60 mM of phosphate ions, 5 to 60 mM of potassium ions, 2 to 50 mM of sodium ions, 0.5 to 9 mM of magnesium ions and 0.5 to 12 mM of calcium ions; a process for producing unsaturated fatty acids or lipids containing the same characterized by culturing microorganisms belonging to the genus <i>Mortierella</i> in media containing 5 to 60 mM of phosphate ions, 5 to 60 mM of potassium ions, 2 to 50 mM of sodium ions, 0.5 to 9 mM of magnesium ions and 0.5 to 12 mM of calcium ions; and media for culturing microorganisms characterized by containing 5 to 60 mM of phosphate ions, 5 to 60 mM of potassium ions, 2 to 50 mM of sodium ions, 0.5 to 9 mM of magnesium ions and 0.5 to 12 mM of calcium ions.</p>		

(57) 要約

培地中のリン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ5～60 mM、5～60 mM、2～50 mM、0.5～9 mM、0.5～12 mMの範囲にある微生物培養用培地を用いて培養中のモルティエラ (*Mortierella*) 属に属する微生物の菌学上の形態を制御する方法、不飽和脂肪酸またはこれを含む脂質の製造方法であって、モルティエラ (*Mortierella*) 属に属する微生物を、リン酸イオンが5～60 mM、カリウムイオンが5～60 mM、ナトリウムイオンが2～50 mM、マグネシウムイオンが0.5～9 mMおよびカルシウムイオンが0.5～12 mMの範囲にある培地中で、培養することを特徴とする不飽和脂肪酸またはこれを含む脂質の製造方法、並びにリン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ5～60 mM、5～60 mM、2～50 mM、0.5～9 mM、0.5～12 mMの範囲にあることを特徴とする微生物培養用培地。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FR	フランス	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SD	スーダン
AT	オーストリア	GE	ジョージア	MC	モナコ	DG	ドミニカ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MD	モルドバ	JM	ジャマイカ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バハマ	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア共和国	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BS	バハマ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CA	カナダ	IT	イタリア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CC	中央アフリカ共和国	JP	日本	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CH	スイス	KE	ケニア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CO	コロンビア	KG	キルギス	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KR	韓国	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KW	クウェート	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	LA	ラオス	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LC	セント・ルシア	RU	ロシア		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LR	リベリア	SG	シンガポール		
		LS	レソト	SI	スロベニア		
				SL	シエラレオネ		

## 明 細 書

微生物培養用培地、並びに不飽和脂肪酸またはこれを含有する脂質の製造方法

## 技術分野

本発明は、新規な微生物培養用培地、並びに該培地中で不飽和脂肪酸生産能を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物を培養して得られる不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法に関する。

## 背景技術

アラキドン酸、ジホモγ-リノレン酸、エイコサペンタエン酸、ミード酸等の不飽和脂肪酸は強力かつ多彩な生理活性を有するプロスタグランジン、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆物質といわれ、近年注目されている。例えばアラキドン酸は、特に乳児の発育に必要な成分として、DHA（ドコサヘキサエン酸）とともに急速に研究が進められており、L a n t i n gらは生後3週間以上母乳で育てた乳児と育児用粉乳で育てた乳児を9歳まで追跡調査し、行動面などから脳神経の小さな障害の発生率を検討した結果、育児粉乳で育った子供の脳障害発生率は母乳で育った子供の2倍であると報告（L A N C E T、v o l . 3 4 4、1 3 1 9 - 1 3 2 2（1 9 9 4））した。

このショッキングな結果は母乳には存在するが育児用粉乳にはほとんど存在しないDHAやアラキドン酸などの不飽和脂肪酸が脳の発達に関係したためだろうと推測されている。この他にも、不飽和脂肪酸が新生児の脳および網膜の発達に関係しているだろうとする

結果が相ついで報告されるようになり、未熟児および新生児栄養の領域においてホットな話題として注目されている。

これら、不飽和脂肪酸は動物界に広く分布しており、例えば、アラキドン酸は動物の副腎腺や肝臓から抽出した脂質から分離されている。しかしながら不飽和脂肪酸の含量は少なく、大量供給方法としては不十分であったことから、種々の微生物を培養して不飽和脂肪酸を得る方法が考案されてきた。中でもモルティエセラ属に属する微生物は、アラキドン酸、ジホモγーリノレン酸、エイコサペンタエン酸等の不飽和脂肪酸を生産する微生物として知られており、この微生物を用いた発酵法による該脂肪酸を製造する方法が開発されている（特開昭63-44891、特開昭63-12290、特開昭63-14696、特開昭63-14697）。

さらにモルティエセラ属微生物に変異処理を施して得られる、 $\Delta$ 12不飽和化活性が低下又は欠失している変異株を用いてミード酸を製造する方法も知られている（特開平5-91888）。また、モルティエセラ属微生物に変異処理を施して得られる、 $\Delta$ 5不飽和化活性が低下又は欠失している変異株を用いて、ジホモγーリノレン酸を著量製造する方法も知られている（特開平5-91887）。

しかし、モルティエセラ属のような糸状菌を用いて液体培地で発酵生産を行なう場合、往々にして菌体増殖による培養液粘度の増加とそれに伴う酸素供給不足が起こり、その対策として開発された溶存酸素濃度制御法（特開平6-153970）は生産性向上に大きく貢献しているものの、工業規模での培養で経済的に優れた高生産を実現するのにこれで十分とはいえず、より安価な培地や微量栄養素の探索、培養液流動性改善のための菌形態の制御法等の幅広い培養技術開発が不可欠である。

このような技術開発の方策として、微量栄養素として塩類の添加が不飽和脂肪酸生産性や菌形態に及ぼす影響が検討されており、中でもカリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸の各イオンについては、添加効果に関して種々の報告が成されている（国際出願 WO 96 / 2 1 0 3 7、特開平 8 - 2 1 4 8 9 3、Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 39, p. 450(1993)、Biotechnology Lett., vol. 12, no. 6, p. 455(1990)、油化学, vol. 37, no. 3, p. 241(1989)、油化学, vol. 42, no. 11, p. 893(1993)）。しかし、一方でこれら主なイオンを全て栄養補給という概念を上回る 0.5 mM 以上の濃度で添加して、より積極的な不飽和脂肪酸生産性向上効果を求めた検討を行ない、なおかつ添加イオンバランスが及ぼす菌形態や脂質組成への影響までも検討した報告は成されておらず、イオン添加法の最適化が望まれるところである。

#### 発明の開示

従って本発明は、モルティエラ属に属する微生物の発酵法による不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法であって、培地に塩類を添加することによって、不飽和脂肪酸生産性、具体的には菌の増殖、不飽和脂肪酸の蓄積、総脂質の蓄積の全てを向上をさせ経済的かつ安定的に不飽和脂肪酸含有油脂を提供しようとするものである。また本発明は例えば不飽和脂肪酸が高収率で得られるなどの利点を有し、かつ安価な微生物培養用培地を提供しようとするものである。

本発明者等は、上記課題を解決するために培地への塩類添加効果について、不飽和脂肪酸収率のみならず、菌形態、脂質組成変化に関して総合的に検討した結果、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸の全イオンを所定の濃度でかつバランス良く添加することが極めて有効であることを見出し本発明を完成し

た。

従って本発明は、リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ5～60 mM、5～60 mM、2～50 mM、0.5～9 mM、0.5～12 mMの範囲にあることを特徴とする微生物培養用培地、並びに当該培地中での糸状菌、特にモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物の培養による、生産性の向上した不飽和脂肪酸またはこれを包含する脂質の製造方法を提供する。

本発明において、不飽和脂肪酸とは炭素数が16以上でかつ二重結合が1個以上の脂肪酸をいい、またこの中で炭素数が18以上でかつ二重結合が2個以上の脂肪酸を一般に高度不飽和脂肪酸といい、例えばγ-リノレン酸、ジホモγ-リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ミード酸、6、9-オクタデカジエン酸、8、11-エイコサジエン酸等を挙げる事ができる。

#### 発明を実施するための形態

本発明の微生物培養用培地は、培地中のリン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ5～60 mM、5～60 mM、2～50 mM、0.5～9 mM、0.5～12 mMの範囲、好ましくはそれぞれ10～45 mM、10～45 mM、5～40 mM、1～6 mM、1～9 mMの範囲にあり、微生物、例えば、糸状菌を培養する際に用いることができる。

本発明の培地を用いることによって、不飽和脂肪酸生産能を有するモルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物の場合、その培養物から不飽和脂肪酸を高収率で得ることが可能となる。なお本発明の培地は、リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン

、マグネシウムイオン及びカルシウムイオン以外の成分（例えば炭素源、窒素源、微量栄養源等）を、使用する微生物に応じて適宜配合することができる。

本発明において、不飽和脂肪酸含有油脂を製造する際使用する微生物は、モルティエレラ（Mortierella）属に属する微生物であればすべて使用することができる。このような微生物としては、例えば MYCOTAXON, Vol. XLIV, No. 2, pp. 257-265(1992)に記載されている菌株を使用することができ、具体的にはモルティエレラ・エロンガタ（Mortierella elongata） IF08570 、モルティエレラ・エキシグア（Mortierella exigua） IF08571 、モルティエレラ・ヒグロフィラ（Mortierella hygrophila） IF05941 、モルティエレラ・アルピナ（Mortierella alpina） IF08568 、ATCC16266 、ATCC32221 、ATCC42430 、CBS 219.35、CBS224.37 、CBS250.53 、CBS343.66 、CBS527.72 、CBS528.72 、CBS529.72 、CBS608.70 、CBS754.68 等のモルティエレラ亜属（subgenus Mortierella）に属する微生物や、モルティエレラ・イザベリナ（Mortierella isabellina） CBS194.28 、IF06336 、IF07824 、IF07873 、IF07874 、IF08286 、IF08308 、IF07884 、モルティエレラ・ナナ（Mortierella nana） IF08190 、モルティエレラ・ラマニアナ（Mortierella ramanniana） IF05426 、IF08186 、CBS112.08 、CBS212.72 、IF07825 、IF08184 、IF08185 、IF08287 、モルティエレラ・ヴィナセア（Mortierella vinacea） CBS236.82 等のマイクロムコール亜属（subgenus Micromucor）に属する微生物を挙げることができる。

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醸酵研究所（I F O）、及び米国American Type Culture Collection（A T C C）、及びオランダCentraalbureau voor Schimmelcultures（C B S）か

らなんら制限なく入手することができる。また、本発明者らが土壌から分離した菌株モルティエレラ・エロンガタSAM0219（微工研菌寄第8703号）（微工研条寄第1239号）を使用することもできる。これらタイプカルチャーに属する菌株、あるいは自然界から分離した菌株はそのまま用いる事ができるが、増殖及び／又は単離を1回以上行なう事によって得られる元の菌株とは性質の異なる自然変異株を用いる事もできる。

また本発明に用いる微生物は、モルティエレラ属に属する微生物（野生株）の変異株又は組み換え株、即ち同じ基質を用いて培養した時に、元の野生株が産生する量と比べて、油脂中の特定の及び／又は全部の不飽和脂肪酸含量が多くなるように、又は総油脂量が多くなるように、あるいはその両方を意図して設計されたものが含まれる。例えば、特定の不飽和脂肪酸含量が多くなるように設計された変異株として、 $\Delta 12$  不飽和化活性の欠失したモルティエレラ・アルピナSAM1861（微工研条寄第3590号、FERM B P-3590）や、 $\Delta 5$  不飽和化活性の欠失したモルティエレラ・アルピナSAM1860（微工研条寄第3589号、FERM B P-3589）を挙げる事ができる。

さらに費用効率の優れた基質を効率良く用いて、対応する野生株と同量の不飽和脂肪酸を産生するように設計された微生物も含まれる。

上記モルティエレラ属に属する微生物は、培地中のリン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンの濃度を所定の範囲に調製すること以外は、常法に従って培養することができる。例えば、上記菌株の孢子、菌糸又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース



、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール、クエン酸、コーンスターチ等の一般に使用されているものが何れも使用できるが、特にグルコース、マルトース、フラクトース、コーンスターチ、グリセロール、クエン酸が好ましい。

窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンスティプリカー、尿素等の有機窒素源、並びに硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いる事ができるが、特に大豆から得られる窒素源を単独または複数で、あるいは前記窒素源と組み合わせて用いることにより、より好ましい塩類添加の相乗効果が得られる。大豆から得られる窒素源としては、水分を除く成分当りの窒素含量が2%以上、好ましくは3%以上、より好ましくは5%以上である事が望ましい。

また、大豆から得られる窒素源としては、脱脂大豆又はこれに熱処理；酸処理；アルカリ処理；酵素処理；化学修飾；又は該処理を含む化学的及び／又は物理的处理による変性及び／又は再生；水及び／又は有機溶媒を用いた一部成分の除去；濾過及び／又は遠心分離による一部成分の除去；凍結；粉碎；乾燥；及び／又は篩い分け等の加工を施したものの、あるいは未脱脂大豆に同様の加工を施したものを単独であるいは複数組み合わせで使用することができ、一般的なものとしては大豆、脱脂大豆、大豆フレーク、食用大豆タンパク、おから、豆乳、きな粉等が挙げられるが、特に、脱脂大豆に熱変性を施したものの、より好ましくは脱脂大豆を約70～90℃で熱処理しさらにエタノール可溶成分を除去したものが好ましい。

この他必要に応じて、リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン以外に、鉄、銅、亜鉛、マンガン、ニッケル、コバルト等の金属イオンやビタミン

等を微量栄養源として使用できる。不飽和脂肪酸の収率を増加せしめるために、不飽和脂肪酸の前駆体として、例えば、ヘキサデカン若しくはオクタデカンのごとき炭化水素；オレイン酸若しくはリノール酸のごとき脂肪酸又はその塩、又は脂肪酸エステル、例えばエチルエステル、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル；又はオリーブ油、大豆油、なたね油、綿実油若しくはヤシ油のごとき油脂類を単独で、又は組み合わせて使用できる。基質の添加量は培地に対して0.001～10%、好ましくは0.5～10%である。またこれらの基質を唯一の炭素源として培養してもよい。

本発明において培地中のリン酸イオンは5～60 mM、カリウムイオンは5～60 mM、ナトリウムイオンは2～50 mM、マグネシウムイオンは0.5～9 mM、カルシウムイオンは0.5～12 mMの範囲とし、好ましくは培地中のリン酸イオンは10～45 mM、カリウムイオンは10～45 mM、ナトリウムイオンは5～40 mM、マグネシウムイオンは1～6 mM、カルシウムイオンは1～9 mMの範囲とする。

これらイオンの調製は、リン酸イオンは、例えば、リン酸一水素二カリウム、リン酸二水素一カリウム、リン酸一水素二ナトリウム及び／又はリン酸二水素一ナトリウム等の塩類、またカリウムイオンは、例えばリン酸一水素二カリウム、リン酸二水素一カリウム及び／又は塩化カリウム等の塩類、ナトリウムイオンは、例えばリン酸一水素二ナトリウム、リン酸二水素一ナトリウム、塩化ナトリウム及び／又は硫酸ナトリウム等の塩類、マグネシウムイオンは、例えば塩化マグネシウム及び／又は硫酸マグネシウム等の塩類、カルシウムイオンは、例えば塩化カルシウム及び／又は炭酸カルシウム等の塩類を培地に添加することにより行うことができるが、これに

限られるものではなく菌の生育を阻害しない物であれば特に制限しない。

なおこれらの塩類は水和物又は無水物のいずれであってもよい。また前記の塩類は、本発明のイオン濃度の範囲内となるよう適宜、組合せて使用される。例えば、リン酸二水素一カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、無水硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、塩化マグネシウム六水和物 ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 及び塩化カルシウム二水和物 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) の4種類を配合して所定量添加することにより、本発明のイオンを所定濃度に調製することができる。

本発明ではこのような塩類添加により、不飽和脂肪酸収率が大幅に増大する。さらに、液体培養における菌形態への影響は、塩類以外の培地成分及び使用する菌株の影響があるため一概には特定し得ないが、例えばリン酸添加量増加に伴ってパルプ形態の菌の割合が増え、ナトリウム、カルシウム、又はマグネシウム添加量増加に伴ってペレット形態の菌の割合が増える。パルプ状での増殖は、培養液粘度を上昇させ、流動性、溶存酸素濃度低下の原因となり収率低下を引き起こす。

一方ペレット状での増殖は粘度上昇が起こりにくく流動性は高いが、ペレット壁が酸素移動の律速となり収率低下を引き起こす。しかし、該イオンを所定濃度でかつバランス良く添加することによって過度のパルプ化、及び過度のペレット化が抑えられ、パルプとペレットの混合状態が維持されることを我々は発見した。この技術によって菌形態の制御が容易になり、非常に高い収率を得る事が可能となる。

上記のようにして得られた不飽和脂肪酸含有脂質は、その大部分がトリグリセリドであるが、培地へのリン酸添加量増加に伴ってリン脂質の割合が増加する。しかし、リン酸以外に、カリウムイオン

、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンを全てバランス良く添加する事によって、菌体脂質中トリグリセリドの割合を90%以上に維持する事ができることを我々は発見した。目的脂質がトリグリセリドの場合、添加塩類を本発明範囲でバランスさせることによって高回収率を維持することができる。

上記の炭素源、窒素源、その他の培地成分は培養開始前の培地及び／又は培養中の培養液に添加することができる。これらの培地成分は一度に添加することもでき、又は連続的に、若しくは複数回に分けて経時的に添加することもできる。これらの培地成分は各々単独で、又は予め混合して殺菌、添加することができ、その殺菌方法、添加順序は特に制限しない。好ましくは、炭素源と窒素源は別々に殺菌するのが望ましく、塩類は対数増殖終了までに、より好ましくは対数増殖中期より前に添加するのが望ましい。リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン濃度に影響を与えない他の培地成分は菌の生育を阻害しない濃度であれば特に制限しない。

実用上、一般に炭素源の総添加量は0.1～40重量%、好ましくは1～25重量%、窒素源の総添加量は0.01～10重量%、好ましくは0.1～10重量%の濃度とするのが望ましく、より好ましくは初発の炭素源添加量を1～5重量%、初発の窒素源添加量を0.1～6重量%として、培養途中で炭素源及び窒素源を、さらにより好ましくは炭素源のみを流加して培養する。培養温度は5～40℃、好ましくは20～30℃とし、また20～30℃にて菌体を増殖せしめた後5～20℃にて培養を続けて不飽和脂肪酸を生産せしめることもできる。

培地pHは4～10、好ましくは5～8として通気攪拌培養、振とう培養、又は静置培養を行う。培養は通常2～20日間行う。こ

のように培養して、菌体内に不飽和脂肪酸を含有する脂質が生成蓄積される。不飽和脂肪酸の製造においては、液体培地による通気攪拌培養が好ましい。

目的とする脂質は、培養によって脂質を製造する途中の培養液若しくはその殺菌した培養液、または培養終了後の培養液若しくはその殺菌した培養液、またはそれぞれから集菌した培養菌体若しくはその乾燥物から、常法に従って得る事ができる。培養菌体から、例えば次の方法により目的とする脂質の採取を行う。

培養終了後、培養液より遠心分離及び／又は濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。培養菌体は好ましくは、水洗、破碎、乾燥する。乾燥は、凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、またメタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム－メタノール－水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができ、好ましくはヘキサンを用いて抽出する。

抽出物から減圧下で有機溶剤を留去することにより、高濃度の不飽和脂肪酸含有脂質を得ることができる。また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。この場合にはメタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とからなる水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。培養物から採取した不飽和脂肪酸含有脂質から不飽和脂肪酸含有トリグリセリドを分離精製するには、常法により、溶媒抽出、脱溶媒の後、脱酸、脱色、脱臭、脱ガム処理、あるいは冷却分離などにより行なう事ができる。

## 実施例

次に、実施例によりこの発明を具体的に説明する。

### 実施例 1.

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (Mortiera lila alpina) CBS754.68 を用いた。グルコース 2 %、大豆油 0.1 % 及び表 1 の組成の窒素源、塩類成分を含む培地 5 L を 4 種類、10 L 培養槽に調製し、初発 pH を 6.0 に調製した。前培養液 50 mL を接種し、温度 28℃、通気量 1.0 vvm、攪拌 300 rpm で 8 日間の通気攪拌培養を行なった。グルコース濃度を 4 日目までは流加法によって 1 ~ 2 % に、それ以降は 0.5 ~ 1 % に維持した。

培養の結果、酵母エキス培地に 5 種類のイオン全てを添加するとアラキドン酸生成量が 1.35 倍に、大豆タンパクに添加すると 1.68 倍に増大し塩類添加の有効性が確認された。リン酸水素カリウムのみ添加した場合は、アラキドン酸生成量増加は認められなかった。

アラキドン酸生成量に加えて、得られた菌体よりヘキサンで脂質を抽出した後、分離条件（ヘキサン：ジエチルエーテル：ギ酸 = 42 : 28 : 0.3）で TLC 法で脂質組成毎に分画し、各組成含量を TLC/FID アナライザー（ヤترون社製イアトロスキャン）で定量した。

その結果、リン酸水素カリウムのみの添加によって、ヘキサンで抽出された菌体脂質中のリン脂質の割合が増えること、一方、リン酸水素カリウムを含む 4 種類の塩類を全て添加することによって、塩類無添加の場合と同等の脂質組成が得られることが判り、目的生産物がトリグリセリドの場合は、全イオンをバランス良く添加することによってトリグリセリド含量の高い脂質が得られることを確認した。

表 1

培 地	酵母 エキス1%	大豆 タンパク 1.5%	酵母エキス 1%	大豆タンパク 1.5%	大豆タンパク 1.5%
			$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.3% (22mM)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.3% (22mM)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.3% (22mM)
			$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (2.5mM)	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (2.5mM)	
			$\text{Na}_2\text{SO}_4$ 0.1% (7.0mM)	$\text{Na}_2\text{SO}_4$ 0.1% (7.0mM)	
			$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (3.4mM)	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (3.4mM)	
75g/100ml 酸生成量	2.28g/L	1.93g/L	3.07g/L	3.24g/L	2.00g/L
総脂肪酸生成量	6.57g/L	5.74g/L	8.82g/L	8.95g/L	5.83g/L
乾燥菌体濃度	17.3g/L	15.7g/L	19.3g/L	22.0g/L	16.0g/L
トリグリセリド 含量	97.2%	97.4%	97.0%	96.0%	88.3%
リン脂質含量	1.2%	1.2%	1.4%	1.2%	9.5%

酵母エキス：ユニバーサルフーズ社製 TASTONE154 AG  
大豆タンパク：味の素社製 エスサンミート特等

実施例 2.

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (Mortiere  
lla alpina) CBS754.68 を用いた。グルコース 2 %、きな粉 1.  
5 %、大豆油 0. 1 % 及び表 2 の組成の塩類成分を含む培地 2 5 L  
を 4 種類、5 0 L 培養槽に調製し、初発 p H を 6. 2 に調製した。  
前培養液 5 0 mL を接種し、温度 2 8 °C、通気量 1. 0 vvm、攪拌 3  
0 0 rpm、槽内圧 2 0 0 kPa の条件で 8 日間の通気攪拌培養を行な  
った。グルコース濃度を 4 日目までは流加法によって 1 ~ 2 % に、  
それ以降は 0. 5 ~ 1 % に維持した。

培養の結果、塩類添加によってアラキドン酸生成量が増大し、塩  
類添加の有効性とより効果的な濃度範囲が確認された。

表 2

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 添加量	0 %	0.075%(5.5mM)	0.3%(22mM)	1.2%(88mM)
MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O添加量	0 %	0.0125%(0.61mM)	0.05%(2.5mM)	0.2%(9.8mM)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 添加量	0 %	0.025%(1.8mM)	0.1%(7.0mM)	0.4%(28mM)
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O添加量	0 %	0.0125%(0.85mM)	0.05%(3.4mM)	0.2%(14mM)
アラキドン酸生成量	2.11g/L	2.61g/L	2.90g/L	1.95g/L

実施例 3.

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (Mortiere  
lla alpina) CBS754.68 を用いた。グルコース 2 %、脱脂大豆粉  
1. 5 %、大豆油 0. 1 % 及び表 3 の組成の塩類成分を含む培地 2  
5 L を 4 種類、5 0 L 培養槽に調製し、初発 p H を 6. 0 に調製し  
た。前培養液 5 0 mL を接種し、温度 2 8 °C、通気量 1. 0 vvm、攪  
拌 3 0 0 rpm、槽内圧 2 0 0 kPa の条件で 8 日間の通気攪拌培養を  
行なった。グルコース濃度を 4 日目までは流加法によって 1 ~ 2 %  
に、それ以降は 0. 5 ~ 1 % に維持した。



塩類無添加培地では、菌形態がペレットとパルプの混合状態で増殖し、ペレットの大部分は米粒型で約 0.5 ～ 1.5 mmであった。リン酸塩のみを加えた培地では、非常に細かいパルプ状に増殖し、培地流動性が大きく低下した。一方、マグネシウム、カルシウム、ナトリウム塩を加えた培地では菌の殆どが球状で約 1 ～ 2 mm径のペレットとなり、流動性は高いが菌体当たりの脂質含量が低い結果となった。しかし、4 種類の塩の全てを添加した培地では、細かい球状ペレットとパルプの混合培養となり、流動性が損なわれることなく、脂質含量が高い菌体を得られ、その結果、アラキドン酸収率向上が達成された。

表 3

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 添加量	0 %	0 %	0.3%(22mM)	0.3%(22mM)
MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O添加量	0 %	0.025%(1.2mM)	0 %	0.025%(1.2mM)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 添加量	0 %	0.05%(3.5mM)	0 %	0.05%(3.5mM)
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O添加量	0 %	0.025%(1.7mM)	0 %	0.025%(1.7mM)
アラキドン酸生成量	2.30g/L	2.20g/L	2.33g/L	3.10g/L

#### 実施例 4.

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IF08570、モルティエレラ・エキシグア (*Mortierella exigua*) IF08571、モルティエレラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IF05941 を用いた。グルコース 2 %、食用大豆タンパク (味の素社製、エスサンプロテイン S S) 1.5 %、なたね油 0.1 % 及び表 4 の組成成分を添加した 6 種類 (2 種類 × 3 菌株) の培地 25 L を各々 50 L 培養槽に調製し、初発 pH を 5.8 に調製した。温度 24 °C、通気量 1.0 vvm、攪拌 200 rpm、槽内圧 1.0 kg/cm<sup>2</sup>G の条件で通気攪拌培養を開始し、7 日間

培養を行った。流加法によりグルコース濃度を 5 日目までは 1.5 %に維持し、その後はグルコースを流加しなかった。培養 7 日目の終了時にはグルコースが枯渇した。

その結果、塩類添加によるアラキドン酸収率増大が確認された。

表 4

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 添加量	0 %	0.3% (22mM)
MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O添加量	0 %	0.05% (2.5mM)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 添加量	0 %	0.1% (7.0mM)
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O添加量	0 %	0.05% (3.4mM)
モルティエラ・エロンガタ IFO 8570 アラキドン酸生成量	1.50g/L	2.20g/L
モルティエラ・エキシグア IF08571 アラキドン酸生成量	1.20g/L	1.45g/L
モルティエラ・ヒグロフィラ IF05941 アラキドン酸生成量	1.25g/L	1.45g/L

#### 実施例 5.

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS754.68 を用いた。初発グルコース 2 %、大豆油 0.1 % 及び培養途中流加も含む表 5 の組成の窒素源及び塩類成分の培地 25 L を 6 種類、50 L 培養槽に調製し、初発 pH を 6.0 に調製した。前培養液 100 mL を接種し、温度 24 °C、通気量 1.0 vvm、攪拌 200 rpm、槽内圧 200 kPa で 8 日間の通気攪拌培養を行なった。

グルコース濃度を 4 日目までは流加法によって 1 ~ 2 % に、それ以降は 0.5 ~ 1 % に維持した。窒素源を流加した場合は溶存酸素濃度を維持するために、表 5 の条件 3 及び 4 は攪拌を 300 rpm ま

で、条件 5 及び 6 は 4 0 0 rpm まで上昇させた。

培養の結果、塩類添加によるアラキドン酸生成量が確認された。  
さらに、栄養源を多量添加して比較的高い濃度で培養を行った場合  
でも、塩類添加効果が確認された。

表 5

条件番号	1	2	3	4	5	6
初発大豆タンパク量	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
大豆タンパク途中流加量			0.6%	0.6%	1.6%	1.6%
初発KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 量		0.3%(22mM)		0.3%(22mM)		0.3%(22mM)
初発MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O量		0.05%(2.5mM)		0.05%(2.5mM)		0.05%(2.5mM)
初発Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 量		0.1%(7.0mM)		0.1%(7.0mM)		0.1%(7.0mM)
初発CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O量		0.05%(3.4mM)		0.05%(3.4mM)		0.05%(3.4mM)
アラキドン酸生成量	3.60g/L	4.90g/L	5.00g/L	6.81g/L	7.32g/L	9.04g/L

大豆タンパク：味の素社製 エスサンミニート特等

実施例 6 .

ミード酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ SAM1861（微工研条寄第3590号、FERM BP-3590）を、ジホモ-γ-リノレン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ SAM1860（微工研条寄第3589号、FERM BP-3589）を用いた。初発グルコース 2 %、大豆タンパク（味の素社製、エスサンミート特等） 1.5 %、オリーブ油 0.1 % 及び表 6 の組成の塩類成分を含む培地 5 L を 4 種類（2 種類 × 2 菌株）、10 L 培養槽に調製し、初発 pH を 6.0 に調製した。前培養液 100 ml を接種し、温度 28 °C、通気量 1.0 vvm、攪拌 300 rpm で 8 日間の通気攪拌培養を行った。培養温度は 2 日目に 20 °C に下げた。また、グルコース濃度を流加法によって 1 ~ 2 % に維持した。

その結果、塩類添加によるミード酸及びジホモ-γ-リノレン酸収率増大が確認された。

表 6

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 添加量	0 %	0.3 % (22mM)
MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O添加量	0 %	0.05 % (2.5mM)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 添加量	0 %	0.1 % (7.0mM)
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O添加量	0 %	0.05 % (3.4mM)
モルティエラ・アルピナ SAM1861 ミード酸生成量	1.52g/L	1.92g/L
モルティエラ・アルピナ SAM1860 ジホモ-γ-リノレン酸生成量	2.06g/L	2.31g/L

実施例 7 .

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (Mortiere  
lla alpina) CBS754.68 を用いた。初発グルコース 2 %、食用大

豆タンパク 4 %、大豆油 0 . 1 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0 . 3 %、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0 . 1 %、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0 . 0 5 %、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0 . 0 5 %の培地 6 0 0 0 L を 1 0 k L 培養槽に調製し、初発 pH を 6 . 1 に調整した。前培養液 3 0 L を接種し、培養温度 2 6 °C、通気量 0 . 5 v v m、攪拌 3 0 r p m、槽内圧 2 0 0 k P a で通気攪拌培養を開始した。培養 1 日目から、溶存酸素濃度を維持するように通気量、回転数を調整しながら培養を続けた。また、1 8 % のグルコースを培養 1 日目から 5 日目にかけて複数回に分けて添加した。

1 0 日間の通気攪拌培養を行った結果、アラキドン酸生成量は 1 3 g / L であった。

第 1 3 規則の 2 に規定する寄託された微生物への言及  
国際寄託当局

名称：工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号

寄託日及び寄託番号：

- (1) 寄託微生物の名称：モルティエセラ・エロンガタ SAM0219

寄託日： 1986年 3 月 19日

寄託番号：FERM BP-1239

- (2) 寄託微生物の名称：モルティエセラ・アルピナ SAM1860

寄託日： 1991年 9 月 30日

寄託番号：FERM BP-3589

- (3) 寄託微生物の名称：モルティエセラ・アルピナ SAM1861

寄託日： 1991年 9 月 30日

寄託番号：FERM BP-3590

## 請 求 の 範 囲

1. 糸状菌の培養において、培地中のリン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオンおよびカルシウムイオンの濃度を制御することによって、培養中の糸状菌の菌学的な形態を制御し、糸状菌の生産物の生産性を高めることを特徴とする糸状菌の培養方法。

2. 培地中のリン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオンおよびカルシウムイオンの濃度が、それぞれ 5 ～ 60 mM、5 ～ 60 mM、2 ～ 50 mM、0.5 ～ 9 mM、0.5 ～ 12 mM の範囲にある微生物培養用培地を用いて糸状菌を培養する請求項 1 に記載の方法。

3. 培地中のリン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオンおよびカルシウムイオンの濃度が、それぞれ 10 ～ 45 mM、10 ～ 45 mM、5 ～ 40 mM、1 ～ 6 mM、1 ～ 9 mM の範囲にある微生物培養用培地を用いて糸状菌を培養する請求項 2 に記載の方法。

4. 糸状菌がモルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物であることを特徴とする請求項 1 に記載の糸状菌を培養する方法。

5. 糸状菌がモルティエレラ属モルティエレラ亜属 (subgenus Mortierella) に属する微生物であることを特徴とする請求項 4 に記載の糸状菌を培養する方法。

6. 生成物が不飽和脂肪酸である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

7. 前記不飽和脂肪酸が  $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ミード酸、6, 9-オクタデカジエン酸及び 8, 11-エイコサジエン酸から成る群から



選択されたものである請求項 6 に記載の方法。

8. 不飽和脂肪酸またはこれを含有する脂質の製造方法であって、モルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物を、リン酸イオンが 5 ～ 60 mM、カリウムイオンが 5 ～ 60 mM、ナトリウムイオンが 2 ～ 50 mM、マグネシウムイオンが 0.5 ～ 9 mM およびカルシウムイオンが 0.5 ～ 12 mM の範囲にある培地中で、培養することを特徴とする不飽和脂肪酸またはこれを含有する脂質の製造方法。

9. 不飽和脂肪酸またはこれを含有する脂質の製造方法であって、モルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物を、リン酸イオンが 10 ～ 45 mM、カリウムイオンが 10 ～ 45 mM、ナトリウムイオンが 5 ～ 40 mM、マグネシウムイオンが 1 ～ 6 mM およびカルシウムイオンが 1 ～ 9 mM の範囲にある培地中で、培養することを特徴とする不飽和脂肪酸またはこれを含有する脂質の製造方法。

10. 前記リン酸イオンが、リン酸一水素二カリウム、リン酸二水素一カリウム、リン酸一水素二ナトリウム及びリン酸二水素一ナトリウムからなる群より選ばれた少なくとも 1 つ以上の塩類によって供給され、前記カリウムイオンが、リン酸一水素二カリウム、リン酸二水素一カリウム及び塩化カリウムからなる群より選ばれた少なくとも 1 つ以上の塩類によって供給され、前記ナトリウムイオンが、リン酸一水素二ナトリウム、リン酸二水素一ナトリウム、塩化ナトリウム及び硫酸ナトリウムからなる群より選ばれた少なくとも 1 つ以上の塩類によって供給され、前記マグネシウムイオンが、塩化マグネシウム及び／又は硫酸マグネシウムの塩類によって供給され、前記カルシウムイオンが、塩化カルシウム及び／又は炭酸カルシウムの塩類によって供給されることを特徴とする請求項 8 または 9

記載の製造方法。

11. 前記イオンが、リン酸二水素一カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、無水硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、塩化マグネシウム六水和物 ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 及び塩化カルシウム二水和物 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) の組合せによって供給されることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載の製造方法。

12. 前記不飽和脂肪酸がアラキドン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、ミード酸及び／又はエイコサペンタエン酸であることを特徴とする請求項 8 乃至 11 のいずれか 1 項記載の製造方法。

13. 前記モルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物が、モルティエレラ亜属 (subgenus Mortierella) に属する微生物である請求項 8 乃至 12 のいずれか 1 項記載の製造方法。

14. 前記モルティエレラ亜属 (subgenus Mortierella) に属する微生物が、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina)、モルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata)、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua) 又はモルティエレラ・ヒグロフィラ (Mortierella hygrophila) である請求項 13 記載の製造方法。

15. さらに前記培地に大豆から得られる窒素源を添加することを特徴とする請求項 8 乃至 14 のいずれか 1 項記載の製造方法。

16. 前記大豆から得られる窒素源が、水分を除く成分当りの窒素含量が少なくとも 2 重量%以上であることを特徴とする請求項 15 記載の製造方法。

17. 前記大豆から得られる窒素源が、脱脂大豆、未脱脂大豆、及びこれらに加工を施したものからなる群より選ばれた少なくとも一つ以上であることを特徴とする請求項 15 又は 16 記載の製造方法。

18. 前記脱脂大豆又は未脱脂大豆に施される加工が、熱処理；酸処理；アルカリ処理；酵素処理；化学修飾；又は該処理を含む化学的及び／又は物理的処理による変性及び／又は再生；水及び／又は有機溶媒を用いた一部成分の除去；濾過及び／又は遠心分離による一部成分の除去；凍結；粉碎；乾燥；及び／又は篩い分けであることを特徴とする請求項 17 記載の製造方法。

19. 前記大豆から得られる窒素源が、脱脂大豆に少なくとも熱変性を施したものであることを特徴とする請求項 15 又は 16 記載の製造方法。

20. さらに前記培地に酵母エキスを添加することを特徴とする請求項 15 乃至 19 のいずれか 1 項記載の製造方法。

21. リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ 5 ～ 60 mM、5 ～ 60 mM、2 ～ 50 mM、0.5 ～ 9 mM、0.5 ～ 12 mM の範囲にあることを特徴とする微生物培養用培地。

22. リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ 10 ～ 45 mM、10 ～ 45 mM、5 ～ 40 mM、1 ～ 6 mM、1 ～ 9 mM の範囲にあることを特徴とする微生物培養用培地。

23. 上記微生物が、糸状菌であることを特徴とする請求項 21 又は 22 記載の微生物培養用培地。

24. 上記微生物が、モルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物であることを特徴とする請求項 21 又は 22 記載の微生物培養用培地。

25. 上記微生物が、モルティエレラ属モルティエレラ亜属 (subgenus Mortierella) に属する微生物であることを特徴とする請求項 21 又は 22 記載の微生物培養用培地。

26. 5 ～ 6 0 m M のリン酸イオン、5 ～ 6 0 m M のカリウムイオン、2 ～ 5 0 m M のナトリウムイオン、0 . 5 ～ 9 m M のマグネシウムイオンおよび0 . 5 ～ 1 2 m M のカルシウムイオンの微生物培養用培地への使用。

27. 1 0 ～ 4 5 m M のリン酸イオン、1 0 ～ 4 5 m M のカリウムイオン、5 ～ 4 0 m M のナトリウムイオン、1 ～ 6 m M のマグネシウムイオンおよび1 ～ 9 m M のカルシウムイオンの微生物培養用培地への使用。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04898

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12P7/64, C12N1/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12P7/64, C12N1/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 57-144986, A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), September 7, 1982 (07. 09. 82) (Family: none)	1 - 27
X	JP, 59-130191, A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), July 26, 1984 (26. 07. 84) (Family: none)	1 - 27
X	JP, 63-133994, A (Lion Corp.), June 6, 1988 (06. 06. 88) & EP, 269351, A	1 - 27
X	JP, 63-240791, A (Kaneka Corp.), October 6, 1988 (06. 10. 88) (Family: none)	1 - 27
X	JP, 3-49688, A (Idemitsu Petrochemical Co., Ltd.), March 4, 1991 (04. 03. 91) & EP, 399494, A & US, 5093249, A	1 - 27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 22, 1998 (22. 01. 98)

Date of mailing of the international search report

February 3, 1998 (03. 02. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04898

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 63-14696, A (Suntory Ltd.), January 21, 1988 (21. 01. 88) & EP, 252716, A & US, 5401646, A	1 - 27
A	JP, 63-14697, A (Suntory Ltd.), January 21, 1988 (21. 01. 88) & EP, 252716, A & US, 5401646, A	1 - 27
A	JP, 63-12290, A (Lion Corp.), January 19, 1988 (19. 01. 88) & EP, 223960, A	1 - 27
X	JP, 5-91888, A (Suntory Ltd.), April 16, 1993 (16. 04. 93)	1-3, 6, 7, 21-23, 26, 27
A	& EP, 535939, A & US, 5322780, A	4, 5, 8-20, 24, 25
A	JP, 8-214893, A (Omegatech Inc.), August 27, 1996 (27. 08. 96) & EP, 726321, A & US, 5583019, A	1 - 27
X	JP, 2-86789, A (NOF Corp.), March 27, 1990 (27. 03. 90) (Family: none)	1-3, 6, 7, 21-23, 26, 27
X	JP, 52-64484, A (Hiroshi Iizuka), May 27, 1977 (27. 05. 77) (Family: none)	1-3, 6, 7, 21-23, 26, 27
X	JP, 1-199588, A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), August 10, 1989 (10. 08. 89) (Family: none)	1-3, 6, 7, 21-23, 26, 27
X	JP, 60-126091, A (The Nisshin Oil Mills, Ltd.), July 5, 1985 (05. 07. 85) (Family: none)	1-3, 6, 7, 21-23, 26, 27

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	2612/97
国際出願日	26.12.97
(受付印)	
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	E914-PCT

第 I 欄 発明の名称

微生物培養用培地、並びに不飽和脂肪酸またはこれを含有する脂質の製造方法

第 II 欄 出願人

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

サントリー株式会社

SUNTORY LIMITED

〒530 日本国大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, OSAKA 530 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

東 山 堅 一 HIGASHIYAMA Kenichi

〒618 日本国大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-602

1-9-5-602, Yamazaki, Shimamoto-cho, Mishima-gun, OSAKA 618 JAPAN

この欄に記載した者は  
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続表に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

弁理士(7751) 石 田 敬 ISHIDA Takashi

〒105 日本国東京都港区虎ノ門三丁目5番1号

虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

A. AOKI & ASSOCIATES

Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomon 3-chome, Minato-ku,

TOKYO 105 JAPAN

電話番号:

03-5470-1900

ファクシミリ番号:

03-5470-1911

加入電話番号:

J 26282

☐ 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続票を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

矢 口 敏 昭 YAGUCHI Toshiaki

〒618 日本国大阪府三島郡島本町山崎5-2-5

5-2-5, Yamazaki, Shimamoto-cho, Mishima-gun, OSAKA 618 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

秋 元 健 吾 AKIMOTO Kengo

〒618 日本国大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-1006

1-9-5-1006, Yamazaki, Shimamoto-cho, Mishima-gun, OSAKA 618 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

清 水 昌 SHIMIZU Sakayu

〒616 日本国京都府京都市右京区常盤山下町6-9

6-9, Tokiwayamashita-cho, Ukyo-ku, Kyoto-shi, KYOTO 616 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名):

住所(国名):

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続票に記載されている。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 第 V 欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと; 少なくとも1つの□にレ印を付すこと).

## 区域特許

- ☐ **AP** **ARIPO** 特許 : **GH** ガーナ Ghana, **KE** ケニア Kenya, **LS** レソト Lesotho, **MW** マラウイ Malawi, **SD** スーダン Sudan, **SZ** スワジランド Swaziland, **UG** ウガンダ Uganda, **ZW** ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国

☐ **EA** **ユーラシア** 特許 : **AM** アルメニア Armenia, **AZ** アゼルバイジャン Azerbaijan, **BY** ベラルーシ Belarus, **KG** キルギスタン Kyrgyzstan, **KZ** カザフスタン Kazakhstan, **MD** モルドヴァ Republic of Moldova, **RU** ロシア連邦 Russian Federation, **TJ** タジキスタン Tajikistan, **TM** トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国

☒ **VEP** **ヨーロッパ** 特許 : **AT** オーストリア Austria, **BE** ベルギー Belgium, **CH** and **LI** スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, **DE** ドイツ Germany, **DK** デンマーク Denmark, **ES** スペイン Spain, **FI** フィンランド Finland, **FR** フランス France, **GB** 英国 United Kingdom, **GR** ギリシャ Greece, **IE** アイルランド Ireland, **IT** イタリア Italy, **LU** ルクセンブルグ Luxembourg, **MC** モナコ Monaco, **NL** オランダ Netherlands, **PT** ポルトガル Portugal, **SE** スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国

☐ **OA** **OAPI** 特許 : **BF** ブルキナ・ファソ Burkina Faso, **BJ** ベニン Benin, **CF** 中央アフリカ Central African Republic, **CG** コンゴ Congo, **CI** 象牙海岸 Côte d'Ivoire, **CM** カメルーン Cameroon, **GA** ガボン Gabon, **GN** ギニア Guinea, **ML** マリ Mali, **MR** モーリタニア Mauritania, **NE** ニジェール Niger, **SN** セネガル Senegal, **TD** チャード Chad, **TG** トーゴ Togo, 及びアフリカ知的財産条約と特許協力条約の締約国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合は点線の上に記載する)

**国内特許** (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線上に記載する)

- [illegible]

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

[illegible]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2. 追記欄 此の追記欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

以下の場合にこの欄を使用する。

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄……の続き」(欄番号を表示する)と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。；特に、

(i) 出願人及び／又は発明者として3人以上いる場合で、「続葉」を使用できないとき。

この場合は、「第Ⅲ欄の続き」と表示し、第Ⅲ欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しているとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」(このような場合があれば)と記載し、該当する出願人の氏名(名称)を表示し、(それぞれの)氏名(名称)の次にその者が出願人となる指定国(及び／又は、該当する場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」(このような場合があれば)と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(及び／又は、該当する場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iv) 第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第Ⅴ欄において指定国(又は、OAPI特許)が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国が「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国(又は、OAPI特許)を表示し、それぞれの指定国(又は、OAPI特許)の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、第Ⅵ欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

2. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

#### IV 欄 の 続 き

氏 名 弁理士(8787) 福 本 積 FUKUMOTO Tsumoru

氏 名 弁理士(8826) 戸 田 利 雄 TODA Toshio

氏 名 弁理士(8289) 西 山 雅 也 NISHIYAMA Masaya

あて名 IV欄に記載のあて名に同じ The same address as Box IV

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 第Ⅵ欄 優先権主張

他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている ☐

下記の先の出願に基づき優先権を主張する

国名 (その国において又はその国 について先の出願がされた)	先の出願の出願日 (日、月、年)	先の出願の出願番号	先の出願を受理した官庁名 (広域出願又は国際出 願の場合のみ記入)
(1) 日本国 JAPAN	27. 12. 96 <sup>✓</sup>	特願平 8-349541号 <sup>✓</sup>	
(2)			
(3)			

先の出願の認証謄本が、本件国際出願の受理官庁（日本国特許庁）で発行される場合であって、優先権書類送付請求書を本件国際出願に添付するときは、次の□にレ印を付すこと。

☐ 上記（ ）の番号の先の出願のうち、次の（ ）の番号のものについては、出願書類の認証謄本を  
作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

## 第Ⅶ欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

ISA / J P

先の調査 上記国際調査機関による別の調査（国際・国際型又はその他）が既に実施又は請求されており、可能な限り当該調査の結果を今回の国際調査の基礎とすることを請求する場合に記入する。先の調査に関連する出願（若しくはその翻訳）又は関連する調査請求を表示することにより、当該先の調査又は請求を特定

、（又は広域官庁）

出願日（日、月、年）

出願番号

## 第Ⅷ欄 照合欄

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

- |          |      |
|----------|------|
| 1. 願書    | 5 枚  |
| 2. 明細書   | 21 枚 |
| 3. 請求の範囲 | 5 枚  |
| 4. 要約書   | 1 枚  |
| 5. 図面    | 枚    |
| 合計       | 32 枚 |

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- |   |  |
|---|--|
| 1. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状                 | 5. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙                   |
| 2. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し                      | <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面      |
| 3. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書                  | <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面                    |
| 4. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第Ⅵ欄の<br>（ ）の番号を記載する）： | 6. <input checked="" type="checkbox"/> 寄託した微生物に関する書面             |
|   | 7. <input type="checkbox"/> スクレオチド及び／又はアミノ酸配列リスト<br>（フレキシブルディスク） |
|   | 8. <input type="checkbox"/> その他（例えば、優先権書類送付請求書と具体的に<br>記載する）：    |

要約書とともに公表する図として 第 \_\_\_\_\_ 図 を提示する（図面がある場合）

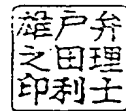
## 第Ⅸ欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

石 田 敬



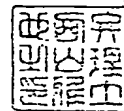
戸 田 利 雄



福 本 積



西 山 雅 也



## 1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

受理官庁記入欄

## 2. 図面

3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって

☐ 受理された☐ 不足図面がある

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された  
国際調査機関

ISA / J P

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に  
調査用写しを送付していない

## 国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式 PCT/RO/101 （最終用紙）（1994年1月、再版1997年7月）

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

09 July 1998 (09.07.98)

International application No.:

PCT/JP97/04898

Applicant's or agent's file reference:

E914-PCT

International filing date:

26 December 1997 (26.12.97)

Priority date:

27 December 1996 (27.12.96)

Applicant:

HIGASHIYAMA, Kenichi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

13 March 1998 (13.03.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

5/1  
1651  
RECEIVED  
FEB 24 2000  
1601 MAIL ROOM

Applicant's or agent's file reference <b>E914-PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/JP97/04898</b>	International filing date (day/month/year) <b>26 December 1997 (26.12.1997)</b>	Priority date (day/month/year) <b>27 December 1996 (27.12.1996)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C12P 7/64, C12N 1/14 // (12P7/64, C12R1:645)</b>		
Applicant <b>SUNTORY LIMITED</b>		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand <b>13 March 1998 (13.03.1998)</b>	Date of completion of this report <b>24 June 1998 (24.06.1998)</b>
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/04898

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/04898

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-27	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

The subject matter of claims 1-27 does not appear to involve an inventive step in view of document 1 [JP, 57-144986, A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), 7 September, 1982 (07.09.82)], document 2 [JP, 59-130191, A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), 26 July, 1984 (26.07.84)], document 3 [JP, 63-133994, A (Lion Corporation), 6 June, 1988 (06.06.88)] and document 4 [JP, 63-240791, A (Kaneka Corporation), 6 October, 1988 (06.10.88)]. It is considered that, when culturing the various types of microorganisms of the genus *Mortierella* disclosed in these documents and collecting the  $\gamma$ -linolenic acid produced, simply increasing the calcium concentration in the culture medium would be obvious to a person skilled in the art.

The subject matter of claims 1-27 does not appear to involve an inventive step in view of document 5 [JP, 3-49688, A (Idemitsu Petrochemical Co., Ltd.), 4 March, 1991 (04.03.91)]. It is considered that, when culturing microorganisms of the genus *Mortierella* and collecting the dihomog- $\gamma$ -linolenic acid produced, simply increasing the calcium concentration in the culture medium would be obvious to a person skilled in the art.

The subject matter of claims 1-3, 6, 7, 21-23, 26 and 27 does not appear to involve an inventive step in view of document 9 [JP, 5-91888, A (Suntory Ltd.), 16 April, 1993 (16.04.93)], document 11 [JP, 2-86789, A (NOF Corporation), 27 March, 1990 (27.03.90)], document 12 [JP, 52-64484, A (Hiroshi Iizuka), 27 May, 1977 (27.05.77)], document 13 [JP, 1-199588, A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), 10 August, 1989 (10.08.89)] and document 14 [JP, 60-126091, A (The Nisshin Oil Mills, Ltd.), 5 July, 1985 (05.07.85)]. It is considered that, when culturing microorganisms other than the microorganisms of the genus *Mortierella* disclosed in these documents in order to obtain unsaturated fatty acids, simply setting the concentrations of inorganic ions in the culture medium to specific values would be obvious to a person skilled in the art.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**






P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 E 9 1 4 - P C T	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 9 7 / 0 4 8 9 8	国際出願日 (日.月.年) 2 6 . 1 2 . 9 7	優先日 (日.月.年) 2 7 . 1 2 . 9 6
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>o</sup> C 1 2 P 7 / 6 4 , C 1 2 N 1 / 1 4 // (C 1 2 P 7 / 6 4 , C 1 2 R 1 : 6 4 5)		
出願人 (氏名又は名称) サントリー株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 1 3 . 0 3 . 9 8	国際予備審査報告を作成した日 2 4 . 0 6 . 9 8	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  吉住 和之 	4 B 9 1 6 5
電話番号 03-3581-1101 内線 3449		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とする)

☒ 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____ ページ、	出願時のもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____ ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____ ページ、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____ ページ、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの

<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____ 項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____ 項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____ 項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____ 項、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____ 項、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの

<input type="checkbox"/> 図面	第 _____ ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____ ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____ ページ/図、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____ ページ/図、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 補正により、下記の書類が削除された。

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____ ページ
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____ 項
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____ ページ/図

3. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

4. 追加の意見(必要ならば)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-27 有

請求の範囲

無

進歩性(I S)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-27 無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲

1-27 有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明

請求の範囲1-27は、文献1(JP, 57-144986, A(工業技術院長)7.9月.1982(07.09.82))、文献2(JP, 59-130191, A(工業技術院長)26.7月.1984(26.07.84))、文献3(JP, 63-133994, A(ライオン株式会社)6.6月.1988(06.06.88))、文献4(JP, 63-240791, A(鐘淵化学工業株式会社)6.10月.1988(06.10.88))により進歩性を有しない。これらの文献に記載の各種モルティエセラ属菌を培養してγ-リノレン酸を採取するに際し、単に培地のカルシウム濃度を増加させることは、当業者にとって自明である。

請求の範囲1-27は、文献5(JP, 3-49688, A(出光石油化学株式会社)4.3月.1991(04.03.91))により進歩性を有しない。モルティエセラ属に属する微生物を培養してジホモγ-リノレン酸を採取するに際し、単に培地のカルシウム濃度を増加させることは、当業者にとって自明である。

請求の範囲1-3、6、7、21-23、26、27は、文献9(JP, 5-91888, A(サントリー株式会社)16.4月.1993(16.04.93))、文献11(JP, 2-86789, A(日本油脂株式会社)27.3月.1990(27.03.90))、文献12(JP, 52-64484, A(飯塚 廣)27.5月.1977(27.05.77))、文献13(JP, 1-199588, A(日東化学工業株式会社)10.8月.1989(10.08.89))、文献14(JP, 60-126091, A(日清製油株式会社)5.7月.1985(05.07.85))により進歩性を有しない。これら文献に記載のモルティエセラ属に属する微生物以外の微生物を培養して不飽和脂肪酸を得るに際し、培地中の無機イオン濃度を単に特定の濃度とすることは、当業者にとって自明である。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

E F



P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 E914-PCT の書類記号	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 7 / 0 4 8 9 8	国際出願日 (日.月.年) 2 6 . 1 2 . 9 7	優先日 (日.月.年) 2 7 . 1 2 . 9 6
出願人 (氏名又は名称) サントリー株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願と共に提出されたもの

☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により  
国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこ  
の国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12P7/64, C12N1/14

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12P7/64, C12N1/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA (STN)、REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 57-144986, A (工業技術院長) 7. 9月. 1982 (07. 09. 82) ファミリーなし	1-27
X	JP, 59-130191, A (工業技術院長) 26. 7月. 1984 (26. 07. 84) ファミリーなし	1-27
X	JP, 63-133994, A (ライオン株式会社) 6. 6月. 1988 (06. 06. 88) & EP, 269351, A	1-27
X	JP, 63-240791, A (鐘淵化学工業株式会社) 6. 10月. 1988 (06. 10. 88) ファミリーなし	1-27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 01. 98

国際調査報告の発送日

03.02.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之



4B

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 3-49688, A (出光石油化学株式会社) 4. 3月. 1991 (04. 03. 91) & E P, 399494, A & US, 5093249, A	1-27
A	J P, 63-14696, A (サントリー株式会社) 21. 1月. 1988 (21. 01. 88) & E P, 252716, A & US, 5401646, A	1-27
A	J P, 63-14697, A (サントリー株式会社) 21. 1月. 1988 (21. 01. 88) & E P, 252716, A & US, 5401646, A	1-27
A	J P, 63-12290, A (ライオン株式会社) 19. 1月. 1988 (19. 01. 88) & E P, 223960, A	1-27
X	J P, 5-91888, A (サントリー株式会社) 16. 4月. 1993 (16. 04. 93) & E P, 535939, A & US, 5322780, A	1-3, 6, 7, 21-23, 26, 27
A	J P, 8-214893, A (オメガテック インコーポレイテッド) 27. 8月. 1996 (27. 08. 96) & E P, 726321, A & US, 5583019, A	4, 5, 8-20, 24, 25
A	J P, 8-214893, A (オメガテック インコーポレイテッド) 27. 8月. 1996 (27. 08. 96) & E P, 726321, A & US, 5583019, A	1-27
X	J P, 2-86789, A (日本油脂株式会社) 27. 3月. 1990 (27. 03. 90) ファミリーなし	1-3, 6, 7, 21-23, 26, 27
X	J P, 52-64484, A (飯塚 廣) 27. 5月. 1977 (27. 05. 77) ファミリーなし	1-3, 6, 7, 21-23, 26, 27
X	J P, 1-199588, A (日東化学工業株式会社) 10. 8月. 1989 (10. 08. 89) ファミリーなし	1-3, 6, 7, 21-23, 26, 27
X	J P, 60-126091, A (日清製油株式会社) 5. 7月. 1985 (05. 07. 85) ファミリーなし	1-3, 6, 7, 21-23, 26, 27

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**